

МОДИФИКАЦИЯ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ/ГАЛОГЕНИРУЮЩИЙ СТРЕСС

Панасенко О.М.¹, Вахрушева Т.В.¹, Григорьева Д.В.², Горудко И.В.²,
Соколов А.В.^{1,3}, Костевич В.А.^{1,3}, Черенкевич С.Н.²

¹ФГБУН НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Миелопероксидаза (МПО) – прооксидантный фермент, содержащийся главным образом в азурофильных гранулах нейтрофилов и высвобождающийся во внеклеточное пространство в очагах воспаления. МПО катализирует реакцию образования активных форм галогенов (АФГ) и кислорода (АФК). Благодаря этой способности фермент осуществляет, с одной стороны, антимикробную функцию, с другой – участвует в целом ряде событий, вовлеченных в повреждение собственных тканей организма, что приводит к развитию окислительного/галогенирующего стресса [1]. При этом МПО, находясь в очаге воспаления, становится мишенью для АФК и АФГ. Цель работы – в условиях, моделирующих возникновение окислительного/галогенирующего стресса, изучить особенности модификации ароматических аминокислотных остатков фермента, а также изменение его пероксидазной и галогенирующей активности, сопоставить результаты с бактерицидной активностью МПО.

Условия возникновения окислительного/галогенирующего стресса моделировали: 1) путем воздействия на фермент АФГ, образующихся в МПО-зависимых реакциях: HOCl , HOBr , хлор- и бромамины; 2) самоинактивацией фермента в присутствии H_2O_2 и субстратов цикла галогенирования: Cl^- , Br^- или SCN^- . В качестве хлор- и бромаминов использовали хлор- и бромамины таурина, синтезированные в реакции таурина с HOCl и HOBr , соответственно. Степень повреждения ароматических аминокислотных остатков МПО оценивали по уменьшению интенсивности собственной флуоресценции фермента ($\lambda_{\text{возб.}}=285$ нм, $\lambda_{\text{исп.}}=340$ нм). Пероксидазную активность МПО определяли спектрофотометрически по окислению хромогенного субстрата *o*-дианизидина [2]. Хлорирующую активность МПО оценивали, используя таурин в качестве перехватчика образующейся HOCl , и регистрируя (спектрофотометрически) последующее окисление хлорамином таурина 5-тио-2-нитробензойной кислоты [3]. Бактерицидную способность МПО тестировали на лабораторном штамме кишечной палочки *E. coli* DH52.

Показано, что инкубация МПО при 23°C в течение 1 ч в присутствии HOCl , NOBr или бромамина таурина (МПО:АФГ=1:100, моль/моль) приводила к существенному снижению интенсивности собственной флуоресценции МПО, что свидетельствовало о разрушении, соответственно, 45, 45 и 38% остатков триптофана. Хлорамин таурина в аналогичных условиях не оказывал заметного влияния на интенсивность собственной флуоресценции МПО. Самоинаktivация фермента в присутствии 140 мМ хлорида или 100 мкМ бромида сопровождалась разрушением, соответственно, 87 и 88% остатков триптофана. При самоинаktivации МПО в присутствии 120 мкМ NaSCN интенсивность собственной флуоресценции МПО не изменялась. После инкубации МПО с HOCl , NOBr или бромамином таурина снижалась как пероксидазная, так и хлорирующая активность фермента, начиная с мольного соотношения МПО:АФГ=1:100 и выше. Хлорамин таурина незначительно снижал активность МПО только при высоких концентрациях (МПО:АФГ=1:1000, моль/моль). Инаktivация МПО при функционировании цикла галогенирования снижалась в ряду субстратов: $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{SCN}^-$. Модификация остатков триптофана и инаktivация фермента сопровождалась снижением бактерицидной активности МПО.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что модификация аминокислотных остатков МПО в условиях окислительного/ галогенирующего стресса, приводящего к развитию патологических реакций, характерных для очагов воспаления, снижает его ферментативную активность, что сопровождается угнетением бактерицидной способности МПО.

Работа поддержана РФФИ (грант 14-04-90007) и БРФФИ (грант Б14Р-035).

Литература:

1. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах. *Успехи биол. химии*. 2013. Т. 53. С. 195–244.
2. Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. Новые подходы к определению концентрации и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме крови человека. *Биоорг. химия*. 2009. Т. 35. С. 629–639.
3. Kettle A.J., Winterbourn C.C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. *Methods Enzymol*. 1994. V. 233. P. 502–512.